

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06049

研究課題名(和文) 圃場と流通における各種ブドウウイルス感染の疫学的考察と対策体制の設立

研究課題名(英文) Grapevine virus epidemiology in Japanese vineyards and Nurseries, and establishment of collaborations to manage the issue.

研究代表者

荷田 瑞穂 (Nita, Mizuho)

信州大学・先鋭領域融合研究群社会基盤研究所・特任准教授

研究者番号：40831954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本におけるブドウウイルスの罹患状況の調査を圃場、苗木業者を対象に行った。コロナ禍で現地訪問が困難のため、常温保存できるNitrocellulose膜を用いたサンプルキットを作成、5種類のブドウウイルスを100%の確率で検知できることを実証。八道府県の圃場から合計132のサンプルを2018年から2021年に取得、比較的実害のリスクの高いGLRaV2, GLRaV3, GRBVの調査を行い48.5%のサンプルがウイルスを保持していることを発見した。そのうち3%がGLRaV2で、GRBVは発見されなかった。この結果を元に日本ブドウ栽培協会とウイルスフリー苗木輸入と保持のための連携を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により日本におけるブドウウイルスが蔓延している状況が明らかになった、世界の地域での結果が15%から25%であることを鑑みると50%近い検知率は非常に高いと言える。この結果を受け、2020年より日本ブドウ栽培協会との連携を行い、日本にウイルスフリーの苗木を輸入、そしてその保全を行うための活動を開始している。これにより将来的にブドウ苗、そしてワインの品質向上が見込まれる。研究題材としては常温保存が可能な特殊な膜を使ったブドウウイルス用のサンプルキットの作成とその実用性が証明できたことも大きい。このキットを用い、冷蔵機材を持ち込めないような場所でも確実にサンプルの採取ができることが証明された。

研究成果の概要(英文)：We developed a NitroPure Nitrocellulose (NPN) membrane-based method for sampling and storing grapevine sap for grapevine virus detection. We devised an efficient nucleic acid extraction method for the NPN membrane, resulting in 100% amplification success for grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV2) and 3 (GLRaV3), grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), grapevine virus A, grapevine virus B, and grapevine red blotch virus (GRBV). This method also allowed the storage of recoverable nucleic acid for 18 months at room temperature. We created a sampling kit to survey GLRaV2, GLRaV3, and GRBV in Japanese vineyards. We tested the kits in the field in 2018 and then conducted mail-in surveys in 2020-2021. The results showed a substantial prevalence of GLRaV3, with 48.5% of 132 sampled vines being positive. On the other hand, only 3% of samples tested positive for GLRaV2 and none for GRBV.

研究分野：植物病理

キーワード：ブドウ ブドウウイルス レッドブロッツ病 リールロール病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本ワインの設立など、ワイン業界の活動は活発になっていたが、散発的なレポートはあったものの、日本の圃場や苗木業者におけるブドウウイルスの現状が不透明であった。

2. 研究の目的

実際の圃場と苗木業者間でのブドウウイルスの罹患状況の検証とそれに基づく対策のため、民間との連携を深める。

3. 研究の方法

コロナ禍で現地訪問が困難のため、常温保存できる Nitrocellulose 膜を用いたサンプルキットを作成、様々なプロトコルを精査し、最終的には5種類のブドウウイルス(leafroll-associated virus 2 (GLRaV2) and 3 (GLRaV3), grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV), grapevine virus A, grapevine virus B, and grapevine red blotch virus (GRBV)) を100%の確率で検知できることを実証。

Table 2. GLRaV3 and GRBV nucleic acid recovery rate from NPN membranes.

Maceration Buffer	Method	Washing Buffer ^a	Template for PCR ^b	GLRaV3 ^c	GRBV ^c
EB	A	No treatment	Disc	0/48	0/48
	B	Triton X-100	Disc	16/48	23/48
	C	FTA reagent	Disc	0/48	0/48
	D1	GES	Disc	33/48	41/48
	D2	GES	2 µL solution	37/48	44/48
	E1	GES + beta-m	Disc	40/48	43/48
	E2	GES + beta-m	2 µL solution	48/48	48/48
GSB	A	No treatment	Disc	0/48	0/48
	B	Triton X-100	Disc	13/48	24/48
	C	FTA reagent	Disc	0/48	0/48
	D1	GES	Disc	31/48	43/48
	D2	GES	2 µL solution	34/48	47/48
	E1	GES + beta-m	Disc	42/48	45/48
	E2	GES + beta-m	2 µL solution	48/48	48/48
Water control	A	No treatment	Disc	0/48	0/48
	B	Triton X-100	Disc	0/48	0/48
	C	FTA reagent	Disc	0/48	0/48
	D1	GES	Disc	0/48	0/48
	D2	GES	2 µL solution	0/48	0/48
	E1	GES + beta-m	Disc	0/48	0/48
	E2	GES + beta-m	2 µL solution	0/48	0/48
Positive control	Traditional nucleic acid extraction method without the membrane [6,18]			48/48	48/48

^a beta m = 1% beta-mercaptoethanol. ^b Disc = Membrane placed directly in a PCR tube, 2 µL = a tube containing a membrane, and the washing buffer was vortexed for 90 s, and then 2 µL of supernatant was taken from the tube for PCR. ^c Number of samples correctly identified as positive/total known positive samples tested.

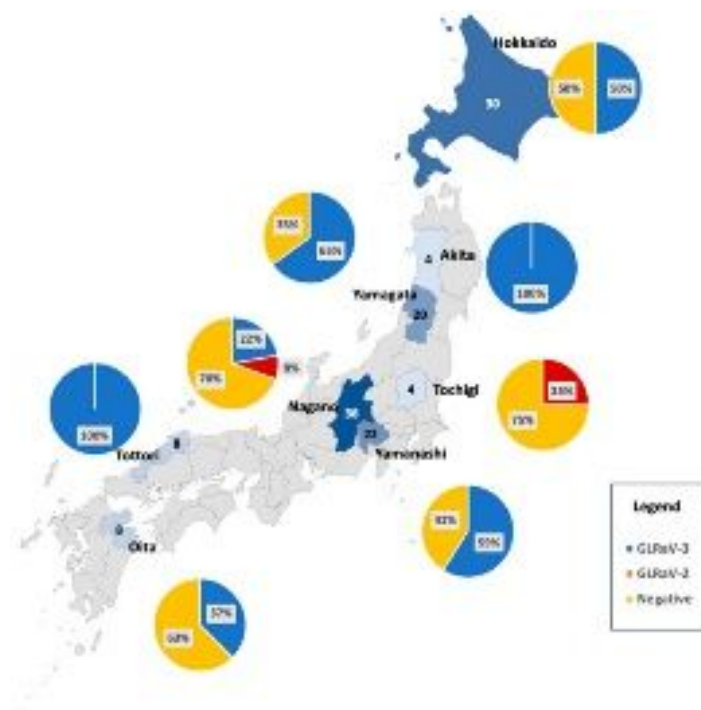
この結果を元に実際にキットと生産者に向けたプロトコルを作成、使用方法を書類、そしてビデオを用いた形で作成した。

Table 3. The NPN membrane grapevine virus sampling kit and its procedures, Japanese vineyard grapevine survey 2020–2021.

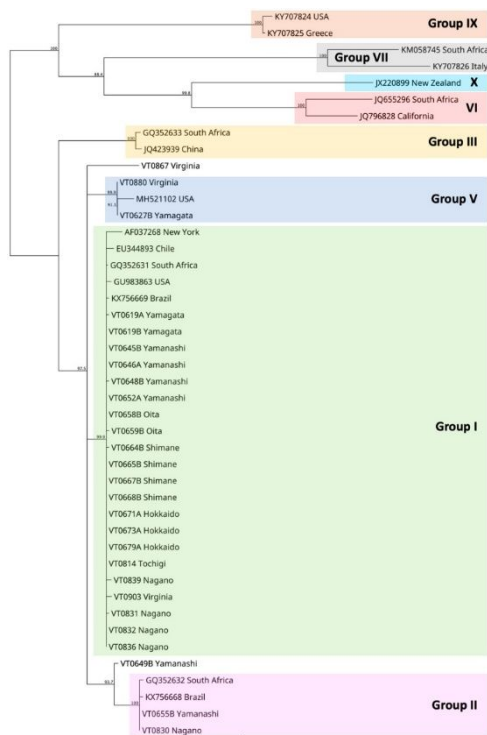
Petiole collection
<ul style="list-style-type: none"> Arbitrarily select fresh grapevine petiole samples from the vine's canopy. Sample both young and old leaves from different parts of the canopy. Record the cultivar and note any observed symptoms at the time of sampling. (Optional) Store the sample in a freezer overnight to soften the tissue.
Blotting
<ul style="list-style-type: none"> Cut the petiole samples into small pieces using a disposable razor blade. Place the petiole cuttings into the bottom of a disposable medicine cup until a layer of tissue covers the bottom. Add pre-measured GSB (1 mL) to each sample cup. Use sterile 15 cm long wood applicators with blunt ends to mash the petiole tissue for 60 to 90 s until the color of the buffer becomes green, and then macerate the tissue for another 60 to 90 s. Dip the wood applicator into the mixture and gently touch/blot it onto an NPN membrane; blot thrice in one spot, and then repeat twice to create three spots per sample. Allow the membrane to dry for at least 24 h, and then cover the surface with the provided protective paper.
Nucleic acid extraction and PCR
<ul style="list-style-type: none"> Remove a 3 mm disc of the blotted membrane using a sterile micro-punch. Place the disc in a 200 μL microcentrifuge tube. Add 50 μL of GES containing 1% beta-mercaptoethanol to the tube. Incubate the tubes at 95 $^{\circ}$C for 10 min, and then vortex for 90 s. Place the tubes on ice. Use 2 μL of the supernatant from the tubes containing discs as a template in a 25 μL total volume PCR reaction specific for each virus using the appropriate primer set (Tables 1 and 2).

4 . 研究成果

八道府県の圃場から合計 1 3 2 のサンプルを 2018 年から 2021 年に取得、比較的実害のリスクの高い GLRaV2, GLRaV3, GRBV の調査を行い 48.5%のサンプルがウイルスを保持していることを発見した。そのうち 3%が GLRaV2 で、GRBV は発見されなかった。



GLRaV3 については遺伝子系統樹の解析も行い、三種の異なるグループが発見された、この結果はこのウイルスが日本に何度かに分けて、もしくは異なる地域から持ち込まれたということを示唆する。



この結果を元に日本ブドウ栽培協会とウイルスフリー苗輸入と保持のための連携を開始した。日本ブドウ栽培協会主催でブドウウイルスに関係したウェビナーを生産者、ワイナリー、苗木業者を対象に2022年と2024年に行い、加えて2023年にはセミナーを山梨と北海道で開催、加えて輸入した苗を育てる母樹園の栽培プロトコル作成に協力。苗木業者とも連携をとり、2024年には協会、苗木業者、そして研究代表者(荷田)で苗木の管理のプロトコル作成のための会議を二度行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jones Taylor, Nita Mizuho	4. 巻 9
2. 論文標題 Gill's mealybug, <i>Ferrisia gilli</i> , can Transmit Grapevine Leafroll-associated Virus-3 after a 24-hour Acquisition Time	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Phytopathology	6. 最初と最後の頁 139 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33687/phytopath.009.02.3385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本のワインブドウ生産者の皆様へ（荷田ラボのサイト） http://grapepathology.org/japan 日本のワインぶどう生産者の皆様へ http://grapepathology.org/japan ぶどうウイルスサンプルキットの使い方：2020 https://www.youtube.com/watch?v=Yyes0YPY-Fs
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鹿取 みゆき (Katori Miyuki) (70774321)	信州大学・経法学部・特任教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

米国	バージニア工科大学			
----	-----------	--	--	--